

Poster P.10.72

SLUGGISH MITOCHONDRIAL FLICKERING AT THE BASIS OF HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA (SPG7)

Sambri I.^[1], Massa F.^[1], Gullo F.^[2], Meneghini S.^[2], Cassina L.^[3], Patanella L.^[1], Santorelli F.^[4], Codazzi F.^[5], Grohovaz F.^[5], Bernardi P.^[6], Becchetti A.^[2], **Casari G.*^[1]**

^[1]Telethon Institute of Genetica and Medicine ~ Naples ~ Italy, ^[2]University of Milano-Bicocca ~ Milan ~ Italy, ^[3]Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[4]Fondazione Stella Maris ~ Pisa ~ Italy, ^[5]Università Vita-Salute San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[6]University of Padova ~ Padova ~ Italy

Corticospinal tract degeneration is the cardinal feature of hereditary spastic paraplegia (HSP), a large group of rare genetic neurological diseases characterized by lower limb spasticity and weakness. Mutation in the SPG7 gene, which encodes the mitochondrial protein paraplegin, cause HSP type 7 (SPG7). Mitochondria play a key role in determining the cell fate during stress condition, through the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), a non-selective channel that opens at high or low conductance mode. High conductance opening leads to cell death programs, conversely, intermittent fast opening and closing of the pore is essential for mitochondrial homeostasis, as it allows to effectively reduce intra-matrix concentration of Ca²⁺ and reactive oxygen species (ROS).

Moreover, mitochondria homeostasis at the synapse is tightly regulated by mPTP gating as neurons experience high metabolic demand during processes such as synaptic vesicle recycling, membrane potential maintenance, and Ca²⁺ exchange/extrusion. We assessed calcium retention capacity (CRC) on Spg7 KO HEK293 cells and found a consistent increase of CRC, thus indicating that the absence of paraplegin does modulate the regulation of mPTP opening. This condition has been further characterized in fibroblasts carrying different SPG7 mutations using TMRM dye for quantitative spatiotemporal analysis of reversible mPTP openings in living cells. SPG7 mutants and paraplegin-null cells display rare opening events compared to controls. SPG7 impaired flickering is rescued to normal by re-expressing paraplegin (transfection of SPG7-IRES-GFP).

Interestingly, fibroblasts deriving from other types of non-SPG7 HSP show normal mPTP opening frequency and amplitude, confirming the paraplegin specific regulatory activity on mPTP modulation. Since Ca²⁺ released from mitochondria regulates synaptic plasticity, mPTP alterations in neurons could be detrimental for synaptic transmission. We found indeed mPTP impairment also in Spg7^{-/-} cortical neurons compare to wild-type and defects in synaptic transmission measured by synaptic vesicle recycling assay, patch-clamp and Multi Electrode Array (MEA). These results demonstrate a pivotal role of paraplegin in mPTP modulation that have important consequences in terms of mechanism of disease and, importantly, for designing an original therapeutic intervention for SPG7-HSP.

L'alterata apertura del canale di membrana mitocondriale (mPTP) è alla base della paraplegia spastica ereditaria di tipo 7 (SPG7)

La degenerazione del tratto corticospinale è la principale caratteristica della paraplegia spastica ereditaria (HSP), un folto gruppo di malattie genetiche rare con coinvolgimento neurologico e caratterizzate da spasticità e debolezza degli arti inferiori. La mutazione nel gene SPG7, che codifica per la proteina mitocondriale paraplegina, causa HSP di tipo 7 (SPG7). I mitocondri svolgono un ruolo chiave nel determinare il destino delle cellule in condizioni di stress, attraverso il poro di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP), un canale non selettivo che si apre in modalità di alta o bassa conduttanza. L'apertura ad alta conduttanza porta a programmi di morte cellulare, al contrario, la rapida apertura e chiusura intermittente del poro (flickering) è essenziale per l'omeostasi

mitocondriale, poiché consente di ridurre efficacemente la concentrazione intra-matrice di Ca^{2+} e delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). In questo lavoro abbiamo valutato la capacità di ritenzione del calcio mitocondriale (CRC) in cellule HEK293 Spg7 KO e abbiamo riscontrato un consistente aumento di tale capacità che indica che l'assenza di paraplegina ha un ruolo chiave nella regolazione dell'apertura dell'mPTP. Questa modulazione è stata ulteriormente caratterizzata nei fibroblasti con diverse mutazioni nel gene SPG7 mediante l'utilizzo del colorante TMRM che permette l'analisi spazio-temporale quantitativa delle aperture reversibili dell'mPTP in cellule viventi. Le cellule mutate in SPG7 mostrano eventi di apertura dell'mPTP più rari rispetto alle cellule controllo. L'alterato flickering in SPG7 viene riportato alla normalità riesprimendo la paraplegina (trasfezione di SPG7-IRES-GFP). È interessante notare che i fibroblasti derivanti da altri tipi di HSP non SPG7 mostrano una normale frequenza e ampiezza di apertura dell'mPTP, confermando la specifica attività della paraplegina nella modulazione dell'mPTP. Poiché il Ca^{2+} rilasciato dai mitocondri regola la plasticità sinaptica le alterazioni dell'mPTP nei neuroni potrebbero essere dannose per la trasmissione sinaptica. Abbiamo infatti riscontrato un difetto di flickering dell'mPTP anche nei neuroni corticali Spg7^{-/-} rispetto ai neuroni controllo, nonché difetti nella trasmissione sinaptica misurati attraverso saggio di misura del riciclo delle vescicole sinaptiche, patch-clamp e Multi Electrode Array (MEA). Nel loro complesso questi risultati dimostrano un ruolo fondamentale della paraplegina nella modulazione dell'mPTP che ha importanti conseguenze in termini di meccanismo d'azione della malattia e, soprattutto, per lo sviluppo di un innovativo intervento terapeutico per SPG7-HSP.

Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Marconi R, Dürr A, Fontaine B, Ballabio A. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*. 1998 Jun 12;93(6):973-83.

Paraplegia Spastica Ereditaria (SPG7)

Coordinator: Giorgio Casari

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2016

Telethon Project (nr):

TIGEM

Disease Name:

Hereditary Spastic Paraplegia Type 7 (SPG7)

Keywords:

mitochondria, permeability transition pore, synapse